

Die Messung der Kupferausscheidung im Harn mit der Atomabsorptionsspektrophotometrie

Von K. M. PIRKE und D. STAMM

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

(Eingegangen am 20. April 1970)

Es wurde eine Methode zur Messung der Kupferkonzentration im Harn mit der Atomabsorptionsspektrophotometrie untersucht. Das Kupfer wird als Carbaminatkomplex gebunden und mit Methylisobutylketon aus dem Harn extrahiert. Die Zuverlässigkeitskriterien wurden ermittelt. An einem Kollektiv (98) gesunder Personen wurden die Normalwerte gewonnen.

Measurement of urinary copper excretion by atomic absorption spectrophotometry

A method was studied for the measurement of urinary copper concentrations by atomic absorption spectrophotometry. The copper is bound as the carbamate complex and extracted from the urine with methylisobutyl ketone. The criteria for reliability were determined. The normal value was determined on a collective (98) of healthy persons.

Die klinische Bedeutung der Kupfer-Messung in Körperflüssigkeiten ist nicht auf die Diagnose des Morbus Wilson beschränkt geblieben. Sie spielt auch bei einer Reihe weiterer Erkrankungen, insbesondere der Leber, sowie neuerdings bei der Behandlung der chronischen Schizophrenie mit D-Penicillamin (1) eine Rolle. Seit einigen Jahren steht mit der Atomabsorptionsspektrophotometrie eine Methode zur Bestimmung des Kupfers zur Verfügung, die wegen ihrer leichten und schnellen Durchführbarkeit, ihrer guten Präzision und ihrer niedrigen Nachweisgrenze den bis dahin hauptsächlich angewandten photometrischen Verfahren überlegen ist (2—10).

Ein weiterer Vorteil ist in der geringen Anzahl der benötigten Reagenzien zu sehen, wodurch die Gefahr der Einschleppung von Kupferspuren vermindert wird. Dem kommt für die Kupfer-Messung im Harn besondere Bedeutung zu, weil die normale Kupfer-Ausscheidung mit durchschnittlich 20 µg in 24 Stdn. außerordentlich gering ist. Bisher wurden zwei Verfahren der Atomabsorptions-Messung des Kupfers im Harn angewandt. Beim ersten (4, 10, 11) wird der Harn direkt in die Flamme hineinversprüht. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß wegen der geringen Oszillatorenstärke des Kupfers ($f_{324,8} = 0,64$) die Messung der niedrigen Harn-Kupfer-Gehalte nur mit extrem empfindlichen Meßanordnungen möglich ist, wie sie üblicherweise nicht zur Verfügung stehen. Bei dem zweiten Verfahren wird das Kupfer als Carbaminatkomplex mit einem organischen Lösungsmittel ausgeschüttelt (2, 3, 5, 6, 8, 9). Das Kupfer kann so in einem kleinen Volumen angereichert

werden. Die Empfindlichkeit der Messungen ist zudem in organischen Lösungsmitteln um ein Vielfaches höher als in Wasser. Das ist hauptsächlich durch die Oberflächeneigenschaften und die daraus resultierende effektivere Zerstäubung bedingt (12). Mit der Extraktionsmethode gelingt es, die Nachweisgrenze so weit zu senken, daß der gesamte Normalbereich der Kupfer-Ausscheidung erfaßt werden kann. Wir benutzten mit geringen Abweichungen die Methode von PARKER und HUMOLLER (8), die auf eine der Extraktion vorausgehende Veraschung, wie sie von anderen Autoren (3, 9) empfohlen wird, verzichtet. Zweck dieser Arbeit ist die Prüfung der Methode und die Ermittlung der Zuverlässigkeitskriterien. An einem Kollektiv gesunder Versuchspersonen wurden die Normalwerte gewonnen.

Methode

Reagenzien

1. Natriumdiäthylthiocarbaminat p. a. Mit demineralisiertem Wasser wird eine 5proz. Lösung angesetzt, die in einer Polyäthylenflasche verwahrt wird.
2. Methyl-iso-butylketon p. a. Das Lösungsmittel wird vor Gebrauch destilliert.
3. Kupfersulfatstammlösung: 0,393 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ werden in einen 1-l-Meßkolben gebracht. Mit demineralisiertem Wasser wird bis zur Marke aufgefüllt. Die Stammlösung enthält 100 mg Cu/l. Sie wird in einem Polyäthylengefäß verwahrt.
4. Eichlösung: 200 µl der Stammlösung werden in einen 20 ml Meßkolben gegeben. Nach Zugabe von 200 µl der Carbaminatlösung und 20 ml Methyl-iso-butylketon wird 2 Min. geschüttelt, 4 ml der organischen Phase werden in einen 10 ml Meßkolben gegeben. Es wird mit Methyl-iso-butylketon bis zur Marke aufgefüllt. Die so erhaltene Eichlösung enthält 400 µg Kupfer/l.

Geräte

Atomabsorptionsspektrophotometer Typ 303¹⁾ mit einer Kupfer-Hohlkathodenlampe. Die benutzte Geräteeinstellung ist in Tabelle 1 aufgeführt.

100 ml/ Schütteltrichter

100 ml/ Reagenzgefäße mit Schliff

10 ml/ Zentrifugenröhrchen mit Schliff

Schüttelmaschine

Reinigung der Glasgefäße

Alle zur Kupferanalyse verwandten Glasgefäße wurden vor Gebrauch 4 Stdn. in 1:1 verdünnte rauchende HCl gelegt und anschließend mit demineralisiertem Wasser nachgespült.

Probenvorbereitung

50 ml/ Harn werden in ein 100 ml/ Reagenzgefäß gegeben. Der pH-Wert wird mit Indikatorpapier (Merck Nr. 9525) gemessen. Neutrale bzw. alkalische Proben werden mit 1N HCl auf pH 6 eingestellt. Dann werden 1 ml/ Carbaminatlösung und 10 ml/ Methyl-iso-butylketon zugegeben. Die Gläser werden mit Stopfen verschlossen und 2 Min. mit der Maschine geschüttelt. Dann wird die Probe in einen 100 ml/ Schütteltrichter überführt. Die wäßr. Phase wird abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird in ein Zentrifugenröhrchen gebracht und 10 Min. bei 3500 U./Min. zentrifugiert. Der klare Überstand wird direkt zur Messung angesaugt.

Messung

Zunächst wird unter Ansaugen der Eichlösung die Brenneinstellung überprüft, da sich diese beim Reinigen leicht verstellen kann. Unter Ansaugen von Methyl-iso-butylketon wird der Nullabgleich vorgenommen. Dann werden alternierend die Absorptionen der Eichlösungen und der Proben gemessen.

Nach Umwandlungen der Absorptionen in Extinktionen ($E = 2 - \log(100 - A\%)$) wird die Kupferkonzentration in der organischen Phase über den Standard errechnet. Den Kupfergehalt der Probe erhält man, indem man den so gewonnenen Wert entsprechend dem Volumenverhältnis Probe/organische Phase (5:1) durch 5 dividiert.

Ergebnisse und Diskussion**Störungen durch Einschleppung von Kupfer-Spuren**

Bei der Analytik von Spurenelementen ist die Gefahr der Einschleppung des zu bestimmenden Elementes aus Reagenzien und von den Gefäßwänden groß. Wir untersuchten zunächst die Frage, ob das von uns zum Spülen und zum Ansetzen der Lösungen benutzte demineralisierte Wasser hinreichend kupferfrei ist. Dazu wurden je 50 ml/ demin. Wasser analog zu den Harnproben durch den gesamten Analysengang geführt. In keiner der Proben konnte Kupfer nachgewiesen werden. Auch wenn das demineralisierte Wasser 24 Stdn. vor Beginn der Analyse in die Gefäße gegeben wurde, fand sich kein Kupfer. Es ging also kein Kupfer von den Gefäßwänden in die Lösung.

Das Methyl-iso-butylketon enthält $10^{-5}\%$ Kupfer. Es wurde destilliert und der Reinheitsgrad regelmäßig durch Messung gegen demineralisiertes Wasser kontrolliert.

Geräteeinstellung

Die optimale Geräteeinstellung wurde folgendermaßen ermittelt: Unter abwechselndem Ansaugen einer definierten Probe und eines Blindwertes wurden die in

¹⁾ Hersteller: Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, USA.

Tab. 1

Optimale Geräteeinstellung

* Preßluft- und Acetylendruck sind in willkürlichen Einheiten angegeben

Lampenstrom	12 mA
Wellenlänge	324,8 nm
Spaltbreite	4 (1 mm, 1,3 nm)
Skalenspreizung	5 X
Preßluftdruck	6*
Acetylendruck	6*

Tabelle 1 aufgeführten Parameter variiert. Die Einstellung, bei der die stärkste Absorption erfolgte, wurde ermittelt.

Eichkurve

Die Eichkurve ist bis $2 \mu\text{g Cu/l}$ Methyl-iso-butylketon gerade. Im Bereich höherer Konzentrationen weist sie eine leichte konvexe Krümmung auf. Durch Einsetzen einer kleineren Harnmenge ist es jedoch möglich, auch bei sehr hoher Kupferausscheidung, wie sie etwa beim behandelten Morbus Wilson beobachtet wird, im geraden Teil der Eichkurve zu messen.

Extraktion des Kupfer-Carbaminat-Komplexes

Besondere Aufmerksamkeit widmeten wir der Frage, ob das im Harn vorhandene Kupfer quantitativ in die organische Phase überführt wird. Ginge der Kupfer-Carbaminat-Komplex nicht vollständig in die organische Phase über, so müßte bei Zugabe einer größeren Menge Methyl-iso-butylketon ein höherer Harn-Kupfer-Gehalt gemessen werden.

Acht 50 ml/ Harnproben wurden einmal mit 10, einmal mit 20 ml/ Methyl-iso-butylketon ausgeschüttelt. Die Meßwerte (Tab. 2) differieren nur geringfügig. Die Paar-

Tab. 2

Cu-Meßwerte bei Extraktion mit unterschiedlichen Mengen Methyl-iso-butylketon. Konzentrationsangaben in $\mu\text{g/l}$

Urinprobe Nr.	Extraktion mit 10 ml Methyl-iso-butylketon	Extraktion mit 20 ml Methyl-iso-butylketon
1	36,2	33,6
2	22,6	22,4
3	25,8	25,2
4	35,4	35,6
5	26,8	28,4
6	26,8	25,2
7	32,6	30,8
8	30,2	33,6

analyse ergab keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den unterschiedlich behandelten Proben. Daß der Kupfer-Carbaminat-Komplex vollständig in die organische Phase übergeht, zeigte auch ein weiterer Versuch: Zu vier 50 ml/ Harnproben wurden je 1 ml/ Carbaminatlösung und 10 ml/ Methyl-iso-butylketon gegeben. Nach dem Ausschütteln wurde die wäßrige Phase abgetrennt. Ihr wurde wiederum 1 ml/ Carbaminatlösung und 10 ml/ Methyl-iso-butylketon zugefügt. Nach dem Abtrennen und Zentrifugieren wurden beide organischen Phasen gemessen. Während sich in der ersten Phase 158, 82, 127 und $141 \mu\text{g Cu/l}$ Methyl-iso-butylketon fanden, lagen die Werte in der zweiten organischen Phase unter der Nachweisgrenze.

Weiterhin wurde untersucht, ob der pH-Wert des Harns einen Einfluß auf die Extraktion des Kupfer-Carba-

minat-Komplexes hat. Es wurden sechs Harnproben, die einen pH-Wert von 6 hatten, analysiert. Der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier (Merck Nr. 9525) gemessen. In parallelen Ansätzen wurden die gleichen Urinproben mit 1N HCl auf pH 3 bzw. mit 2,5N KOH auf pH 8 eingestellt. Die weitere Probevorbereitung erfolgte wie oben geschildert. Die Meßwerte bei pH 6 wurden gleich 100% gesetzt. Bei pH 3 betrugen die Werte zwischen 97,7 und 104,2%, im Mittel 101,3%. Die Meßwerte der alkalischen Proben waren um 9 bis 39 im Mittel um 21,3% geringer als die der Proben bei pH 6. Die Phasentrennung bei pH 8 war schlecht. Es wurden großflockige Niederschläge in der wäbr. Phase beobachtet. Es ist daher notwendig, den pH-Wert der Proben zu prüfen und sie gegebenenfalls anzusäuern. BODE (13) führt die geringere Extraktion aus wäbr. alkalischer Lösung darauf zurück, daß das Kupfer zum Teil als Kupferhydroxyd ausfällt und nicht komplex gebunden wird. SUNDERMANN und ROSZEL (9) lassen der Extraktion eine feuchte Veraschung vorausgehen. Nach ihren Angaben ist die Extraktion des Kupfers aus dem Harn ohne Veraschung nicht vollständig. Das steht im Gegensatz zu unseren Befunden und denen von PARKER und HUMOLLER (8). Es sollte allerdings die Möglichkeit erwogen werden, daß das nach der Veraschung zusätzlich gefundene Kupfer aus den für die feuchte Veraschung benutzten Reagenzien stammt, zumal über deren Reinigung nichts berichtet wird.

Prüfung der Zuverlässigkeitskriterien

Präzision

Durch tägliche Analyse eines Poolurines wurde die Streuung von Tag zu Tag bestimmt ($n = 16$). Die Standardabweichung betrug $1,45 \mu\text{g/l}$ bei einem Mittelwert von $31,5 \mu\text{g/l}$. Der Variationskoeffizient betrug 4,6%. Die Streuung in der Serie wurde aus Doppelbestimmungen ermittelt. Die Standardabweichung betrug $0,45 \mu\text{g/l}$, der Variationskoeffizient 1,41%.

Aufstockungsversuche

Zu 11 Harnproben wurden je $40 \mu\text{g/l}$ Kupfer hinzugefügt, die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Wiederauffindungsrate betrug zwischen 95 und 109%, im Mittel 100,3%.

Tab. 3
Aufstockungsversuche. Verwandt wurden frische Morgenurine. Die Werte sind in $\mu\text{g/l}$ angegeben

Urinprobe Nr.	Meßwert vor dem Aufstocken	Meßwert nach dem Aufstocken mit $40 \mu\text{g/l}$ Cu	Wiederauffindungsrate in %
1	12,8	55,0	105,5
2	30,4	74,0	109,0
3	38,8	77,2	97,0
4	43,8	84,6	102,0
5	25,6	63,6	95,0
6	23,8	64,0	100,5
7	62,4	101,4	97,5
8	16,4	56,8	101,0
9	32,4	71,6	98,0
10	32,8	78,2	100,0
11	31,4	70,4	97,5

Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Als Maß für die Empfindlichkeit der Methode wird bei der Atomabsorptionsspektrophotometrie häufig die „sensitivity“ angegeben. Darunter wird diejenige Konzentration des zu messenden Stoffes verstanden, die gerade 1% des Meßstrahles absorbiert. Sie betrug hier $30 \mu\text{g/l}$ Methyl-iso-butylketon, das entspricht einer Konzentration im Harn von $6 \mu\text{g/l}$. Dagegen ermittelten wir bei der Messung wäbr. Standardlösungen eine „sensitivity“ von $93 \mu\text{g/l}$. Die hier untersuchte Methode steigert also die Empfindlichkeit um das 15,5fache. Die Nachweisgrenze wurde nach KAISER (14) aus der Streuung der Blindwerte von Tag zu Tag ermittelt ($n = 10$). Sie betrug $16 \mu\text{g Cu/l}$ Methyl-iso-butylketon. Das heißt, im Harn können Mengen, die kleiner als $16/5 = 3,2 \mu\text{g/l}$ sind, nicht nachgewiesen werden.

Normalwerte

98 klinisch gesunde Personen sammelten einen 24-Stdn.-Urin. Davon waren 52 Männer im Alter von 18 bis 66 Jahren und 46 Frauen im Alter von 18 bis 62 Jahren. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse. Da keine Normalverteilung vorliegt, wurden die Kollektive durch den Median und die 95-Perzentilgrenze charakterisiert. Statistisch läßt sich ein Geschlechtsunterschied sichern (Wilcoxon-Test, $p < 0,001$). Zum Nachweis einer Altersabhängigkeit reicht die Größe des Kollektives nicht aus.

Tab. 4
Normalwerte der Kupfer-Ausscheidung im Urin. Angaben in μg pro 24 Stunden

Kollektiv	Median	95-Perzentilgrenzen
Männer $n = 52$	24,2	13,1—42,9
Frauen $n = 46$	19,2	8,8—37,1
Gesamt $n = 98$	21,6	9,2—41,4

Tab. 5
Literaturzusammenstellung. Angaben über die Normalbereiche der Kupfer-Ausscheidung im Harn. P = Photometrisch. AAS = Atomabsorptionsspektroskopie

Autoren	Zahl der untersuchten Personen	Methode	Normalbereich μg pro 24 Stdn.
TOMPSETT (18) 1934	6	P	210—380
LEVERTON (18) 1939	24	P	25—320
VON RAVESTEYN (18) 1944	4	P	0—100
HOLT und SCOUER (18) 1948	17	P	20—675
PORTER (18) 1951	11	P	0—14,7
MATTHEWS (18) 1952	17	P	10—68
BEARN und KUNKEL (17) 1953	11	P	31,7—64,3
BUTLER and NEWMAN (16) 1956	12	P	3,9—29,6
GIORGIO und Mitarbeiter (19) 1964	20	P	8—57
CARTWRIGHT und Mitarbeiter (20) 1964	46	P	10—20
WILSON und KLASSEN (21) 1966	20	P	8—22
SUNDERMAN, ROSZEL (9) 1967	21	AAS	7,5—33,8
DAWSON und Mitarbeiter 1968	10	AAS	26—64

Tabelle 5 faßt die in der Literatur mitgeteilten Normalwerte für die Kupferausscheidung im Harn zusammen. Die Zahl der untersuchten Personen ist überwiegend sehr klein und reicht zur Festlegung des Normalbereiches nicht aus (15). BUTLER und NEWMAN (16) konnten zeigen, daß die sehr hohen Werte früherer Arbeiten auf methodische Unzulänglichkeiten zurückzuführen sind. Dagegen sind die in neueren Arbeiten

mitgeteilten Werte recht einheitlich und stehen in guter Übereinstimmung mit den von uns gefundenen Werten.

Danksagung

Wir danken Herrn Prof. Dr. R. HERRMANN, Gießen, für die Durchsicht des Manuskriptes. Fräulein SIEMESTER danken wir für die technische Assistenz bei der Messung des Normalkollektives.

Literatur

1. KANIG, K. und U. BREYER, *Pharmakopsychiatrie* 2, 190 (1969).
- 2. BERGE, D. G. und R. T. PFLAUM, *Amer. J. Med. Technol.* 34, 725 (1968).
- 3. BERMAN, E., *Clinical Chem. (New York)* 9, 459 (1963).
- 4. DAWSON, J. B., D. J. ELLIS und H. NEWTON-JOHN, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 21, 33 (1968).
- 5. DEVOTO, G., *Boll. Soc. ital. biol. sper.* 44, 1249—1251 (1968).
- 6. GIRARD, M. L., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 20, 243 (1968).
- 7. HERRMANN, R. und W. LANG, *diese Z.* 1, 182 (1963).
- 8. PARKER, M.-M., F. L. HUMOLLER und D. J. MAHLER, *Clin. Chem. (New York)* 13, 40 (1967).
- 9. SUNDERMANN, F. W. und N. O. ROSZEL, *Amer. J. Clin. Path.* 48, 286 (1967).
- 10. SLAVIN, W., *Occupational Health Rev.* 17, 9 (1965).
- 11. HOLTZMANN, N. A., D. A. ELLIOTT und R. H. HELLER, *N. England J. Med.* 275, 347 (1966).
- 12. ALLAN, J. E., *Spectrochim. Acta* 17, 467—473 (1961).
- 13. BODE, H., *Z. analyt. Chem.* 144, 165 (1955).
- 14. KAISER, H., *Z. analyt. Chem.* 209, 1 (1965).
- 15. BÜTTNER, H., E. HANSERT und D. STAMM, in Vorbereitung.
- 16. BUTLER, J. E. und G. E. NEWMAN, *J. clin. Path. London* 9, 157 (1956).
- 17. BEARN, A. G. und H. G. KUNKEL, *J. Clin. Invest.* 33, 400 (1954).
- 18. Zitiert nach E. J. BUTLER und G. E. NEWMAN (16).
- 19. GIORGIO, A. J., G. E. CARTWRIGHT und M. M. WINTROPE, *Amer. J. Clin. Path.* 41, 22—26 (1964).
- 20. CARTWRIGHT, G. E. und M. M. WINTROPE, *Amer. J. Clin. Nutr.* 14, 224 (1964).
- 21. WILSON, J. F. und W. H. KLASSEN, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 31, 766—774 (1966).

P. D. Dr. Dr. D. Stamm
8 München 23
Kraepelinstr. 10